Sull'uso di un opacimetro (vaccinoscopio Gosio) come mezzo pratico di titolazione dei vaccini

per

il Dott. CARLO BELFANTI

Tenente Medico comandato per la preparazione dei vaccini

(*Dai Laboratori dell'Istituto Sieroterapico Milanese*
Direttore Prof. Dott. **S. Belfanti**)

Le critiche più o meno fondate che vengono abbastanza frequentemente fatte dai medici pratici che, usando forti quantità di vaccini ne osservano spesso la varia densità, mi hanno portato a studiare un mezzo che potesse servire a togliere quest'inconveniente che può succedere a chi ha da preparare grandi quantità di tali prodotti.

La pratica, infatti, acquistata preparando per molti mesi forti quantità di vaccino antitifico ed anticolerico ad uso dell'esercito, mi aveva già portato ad osservare come, pur tenendo uguali il terreno nutritizio, il periodo d'incubazione e il modo di preparazione dei vaccini stessi, ben variabile ne fosse la crescita batterica sul materiale nutritizio. Si capisce quindi come il quantitativo in germi di un vaccino possa avere delle variazioni molto sensibili, variazioni che poi all'atto pratico si ritrovano in una diversa densità del vaccino stesso, come ai pratici è giustamente accaduto di constatare.

Quest'osservazione, confermata dal fatto che parecchi vaccini all'esame diedero un tenore in germi molto minore (Löwy) e in qualche caso (Rembold) molto maggiore del fissato, ha fatto sì che dagli odierni preparatori di vaccini si cercasse un metodo pratico e rapido di dosaggio del tenore in germi di essi, metodo che con un tasso di errore molto minimo rispondesse alle speciali esigenze del momento e cioè permettesse di esaminare rapidamente grandi quantità delle preparazioni, consentendo nello stesso tempo all'operatore di riportare il vaccino stesso ad un eguale tenore in germi di una soluzione esattamente titolata; non essendo possibile il controllo della numerazione quando (come all'Istituto accadde) si deve procedere alla preparazione di ettolitri di emulsioni vaccinali, e dovendo in certuni tempi settimanalmente dare un quantitativo di trecentomila vaccinazioni.

In un primo tempo infatti ci si accontentò (come del resto in tutti gli Istituti) di un calcolo approssimativo dei germi. Noi sappiamo per esperienza comune che un'ansa di 2 milligrammi contiene circa due miliardi e trecento milioni di germi tifici, che la superficie di un agar comune è valutata a 10 anse e che la piastra in uso all'Istituto può essere valutata a 200 anse, ossia 18 a 20 agar comuni.

Il computo quindi per avere per cmc. un

tenore di germi quale era quello stabilito per un vaccino era così facilitato.

La Direzione dell'Istituto ha poi sempre voluto che le emulsioni batteriche peccassero più in eccesso che in difetto: il perchè di questo è troppo ovvio. Col regolarizzarsi della produzione anche la questione della maggior precisione nei dosaggi si è venuta imponendo, sebbene i quantitativi più alti riscontrati in alcune preparazioni (talora anche del doppio) non abbiano dato praticamente sull'uomo luogo ad inconvenienti, come fu molto spesso dato di constatare.

Vari furono e sono i metodi usati oggidì per titolare i vaccini e tra essi rispondono meglio allo scopo — il metodo del conteggio dei germi col contaglobuli di Thoma-Zeiss — il conteggio col metodo di Wright — il conteggio col metodo Valagussa — il conteggio delle colonie mediante il metodo delle piastre — gli opacimetri, radunando tra questi ultimi tutti i metodi che basano il conteggio sulla diversa trasparenza delle emulsioni batteriche a seconda del loro maggiore o minore tenore in germi.

Certo il conteggio diretto, cioè quello fatto o col sistema Thoma-Zeiss o col sistema Valagussa, o col metodo Wright, è quello che meglio risponde allo scopo se si deve eseguire un conteggio accurato, o su una produzione di vaccino ridotta; ma dovendo, come si è detto, usare un metodo che permetta di esaminare rapidamente e praticamente grandi quantità di vaccino, il migliore procedimento resta quello che si basa sull'opacità per intorbidamento dovuto alla presenza di germi specifici in un liquido. Infatti su questo principio si basa la maggior parte di coloro che si occupano di preparare o controllare vaccini in grosse quantità: Vincent, Neumann, Ditthorn e Loewenthal, Rembold, Soltmann, Mohrmann e tra gli italiani Porcelli-Titone e Gosio hanno tutti studiato e usano dei metodi che, pur essendo diversi nell'uso o nella forma, si basano tutti sulle misure opacimetriche. Parecchi di essi hanno anche confrontato i risultati avuti col conteggio diretto del vaccino, coi risultati ottenuti per mezzo di opacimetri, ed hanno trovato che fra i due sistemi la differenza è minima e gli errori restano trascurabili (Rembold).

Molti di questi metodi, basati sul principio delle misure opacimetriche, si servono di un vaccino campione, che viene confrontato col vaccino in esame, campione all'opacità del quale si cerca di ridurre, o coll'aggiunta di soluzione fisiologica o coll'aggiunta di nuova massa batterica, il vaccino da esaminare. Ciò ha però lo svantaggio che questo vaccino testo, per *fenomeni di autolisi,* può cambiare col tempo la sua opacità e quindi non può più servire come campione di riferimento, ed in questo caso occorre preparare nuovamente un vaccino testo, che deve essere pure ricontrollato più esattamente con uno o con vari dei metodi di conteggio: è per ciò che, d'accordo col Prof. Gosio, io ritengo più giusto usare una volta tanto un vaccino campione di cui si conosca esattamente il titolo e vedere su un sistema scalare quale cifra occorra ottenere per fare scomparire, per mezzo dell'opacità del vaccino, un segno grafico qualsiasi che trovasi sull'opacimetro; riportandoci poi sempre a questa cifra, che chiameremo cifra testo, per confrontare gli altri vaccini. Avremo con ciò eliminato appunto l'inconveniente dell'alterazione autolitica del vaccino testo; inoltre l'occhio nostro, non obbligato a confrontare contemporaneamente due soluzioni, avrà all'atto dell'esame dell'emulsione un potere visivo più regolare e più uniforme.

Grazie alla cortesia del Prof. Gosio, direttore dei Laboratori della Sanità Pubblica, che gentilmente ha voluto inviare all'Istituto Sieroterapico un suo vaccinoscopio da provare e controllare, io ho potuto eseguire delle ricerche sul vaccino anticolerico ed antitifico preparato da me nell'Istituto stes-

so, che vengono coi loro risultati a confermare l'utilità e la grande praticità del metodo delle misure opacimetriche e che dimostrano pure come il vaccinoscopio ideato dal Prof. Gosio, corrisponda egregiamente e praticamente allo scopo che si prefigge, di permettere cioè l'esame e il controllo rapido di grandi quantità vaccinali con un'esattezza molto notevole, che accresce certamente il valore del vaccinoscopio.

L'apparecchio di Gosio consta (vedi figura), come lo descrive l'A. in una sua nota, di due cilindri di vetro immissibili esattamente uno nell'altro nel modo di una comune siringa Luer. La superficie di contatto di entrambi è a finissimo smeriglio per assicurare la perfetta tenuta; il fondo è chiuso e trasparente; il cilindro esterno però vicino al fondo stesso comunica nella sua parte superiore con un imbuto munito di rubinetto e di coperchio. Nell'imbuto si versa il vaccino che si deve esaminare; infatti aprendo il rubinetto si può, mediante il cilindro interno funzionante a stantuffo, aspirare o comprimere in modo che a volontà si può fare entrare liquido nel corpo del cilindro esterno, od espellerlo, quando ne fosse entrato di troppo.

Tale apparecchio di vetro forma un sistema a canocchiale che si dispone orizzontalmente e in cui si considerano tre accessori importanti: e cioè, un sistema graduato, un diaframma circolare, una lampadina elettrica.

Il sistema graduato sta in immediato rapporto col vaccinoscopio ed è costituito da un manicotto metallico aperto longitudinalmente verso l'alto e che viene a ricoprire il cilindro esterno; esso porta due scale; una di esse, la più importante, indica il volume di liquido introdotto nel cilindro esterno, l'altra è una scala millimetrata che indica lo spessore dello strato liquido e può campionarsi a piacere dell'osservatore in base al valore ponderale, o a quello numerico del quantitativo batterico che il vaccino contiene. Inserito alla parte terminale del manicotto di metallo che circonda il cilindro esterno e che porta la graduazione, si trova un disco di vetro smerigliato, sul quale al centro è impresso un segno grafico, che nel nostro caso è una crocetta nera, disco che viene così a trovarsi a contatto parallelamente colla parete esterna del fondo del cilindro esterno. Segue da ultimo una lampadina elettrica della forza di 10 candele a forma di fiamma, che viene a trovarsi sullo stesso asse, diremo, dei due cilindri e dell'estremità anteriore a mezzo centimetro dal disco terminale.

Nell'apparecchio fornitomi dal Prof. Gosio il terzo posteriore del manicotto di metallo, cioè il fondo dei due cilindri, il disco smerigliato e la lampadina, sono chiusi in una piccola camera oscura, per avere sempre le identiche condizioni di luce riflessa: all'atto pratico tale camera però si è dimostrata inutile, anzi dannosa, perchè il calore che si sviluppa dalla lampadina trovandosi in ambiente chiuso, provoca rapidamente delle condensazioni di vapore sulla parete del disco di vetro smerigliato, offuscando molto la visione e rendendo talora impossibile la lettura. Coll'autorizzazione del Prof. Gosio, io ho portato alcune piccole modificazioni che hanno servito a rendere il vaccinoscopio più pratico: a questo scopo ho abolito la camera oscura, mettendo al suo posto tra la lampadina elettrica ed il sistema dei cilindri uno schermo nero abbastanza grande, con un foro al centro, in modo da lasciare cadere la luce della lampada solo sul disco smerigliato che porta la croce e quindi sul fondo del vaccinoscopio, senza lasciare che altra luce venga a colpire l'osservatore, il quale è meglio perciò si trovi in un locale oscuro.

Per far funzionare l'apparecchio, dopo di avere unto leggermente con vaselina il rubinetto ed il cilindro interno, o stantuffo, a scopo di impedire che malgrado la sme-

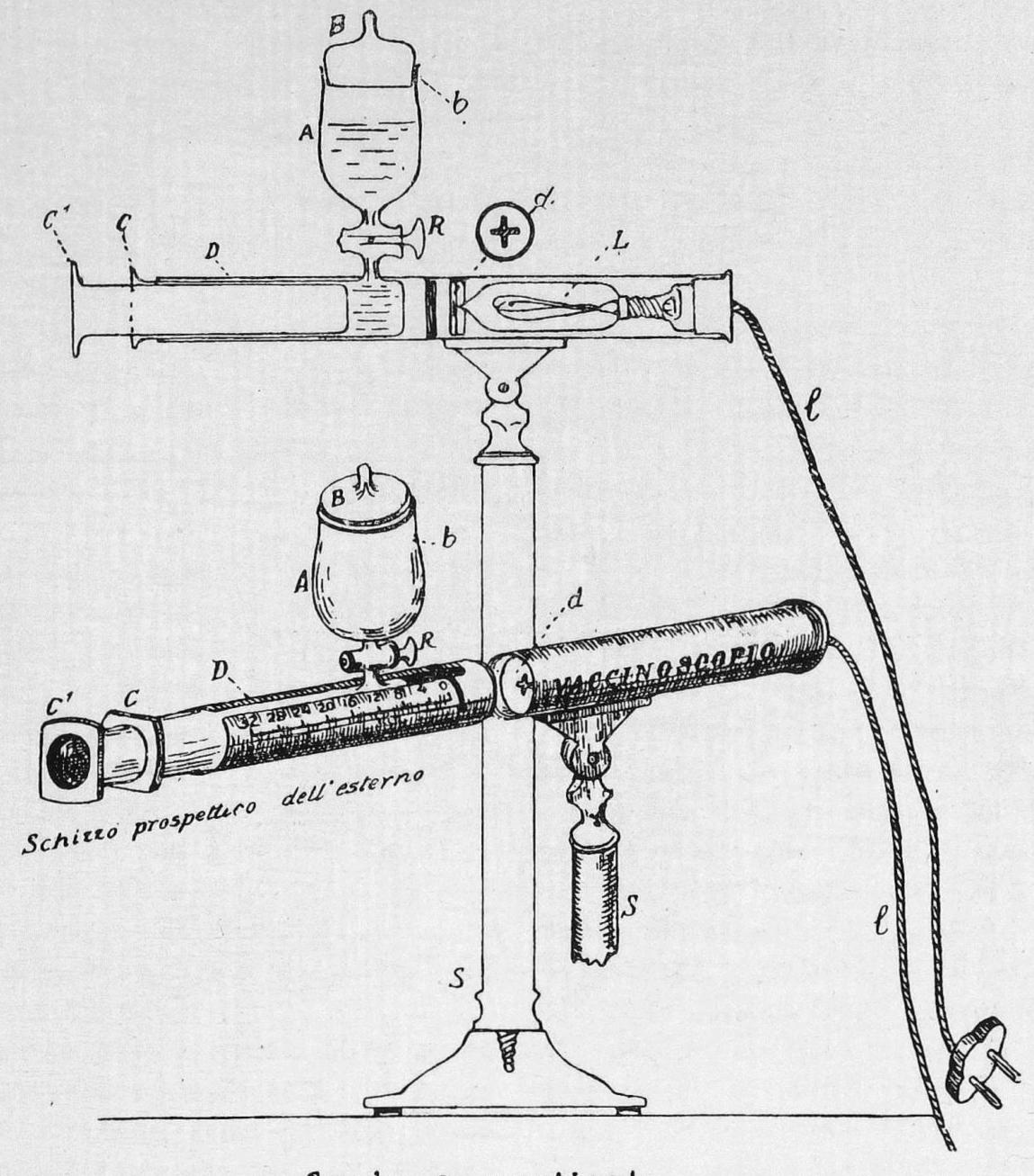
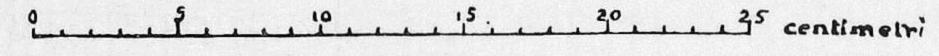
rigliatura fuoriesca del liquido nelle manovre di aspirazione o di compressione, si riempie l'imbuto della soluzione di vaccino da esaminare e si illumina la lampadina elettrica. Indi, aperto il rubinetto, si aspira un po' di liquido con dei movimenti a spirale usando il cilindro interno come stantuffo, quindi si respinge il liquido con delicatezza nell'imbuto, comprimendo collo stantuffo allo scopo di fare uscire le bolle d'aria che possono essere rimaste nell'interno del sistema: alternati un po' di volte questi movimenti di aspirazione e di compressione, si aspira nuovamente con dolci movimenti a spirale tanto liquido quanto basta a far scomparire completamente la visione della crocetta nera posta sul disco di vetro e si leggono sul manicotto esterno le cifre dei due sistemi scalari, che corrispondono al filo dello strato liquido aspirato. Così per varie volte con alternative ben graduate d'aspirazione e di compressione ci si assicura del punto esatto in cui si verifica il fenomeno indice, facendo così varie letture e prendendo infine come cifra indice la media della nostra lettura.

È importante ora procedere al campionamento dell'apparecchio secondo la propria vista, perchè le differenze individuali possono essere grandi ed il non tenerne calcolo sarebbe una causa di errori non indifferente. Perciò conviene prendere un vaccino fresco previamente ben titolato con uno, o meglio con parecchi dei metodi già citati per il conteggio diretto (metodo Valagussa, metodo Thoma-Zeiss, metodo Wright) ed esaminare colle manovre sopradescritte, quale sia la cifra che segna la scomparsa della croce con tale vaccino campione, notando sia la cifra che indica lo spessore dello strato liquido (scala millimetrata a sinistra), sia la cifra che indica il volume (scala di destra). Campionato così l'apparecchio, è possibile non solo controllare vaccini dello stesso tipo già preparati, ma è anche facile, per chi deve produrre grandi quantità di vaccino, ottenere la stessa densità del vaccino, densità che corrisponda al quantitativo in germi fissato per il vaccino stesso.

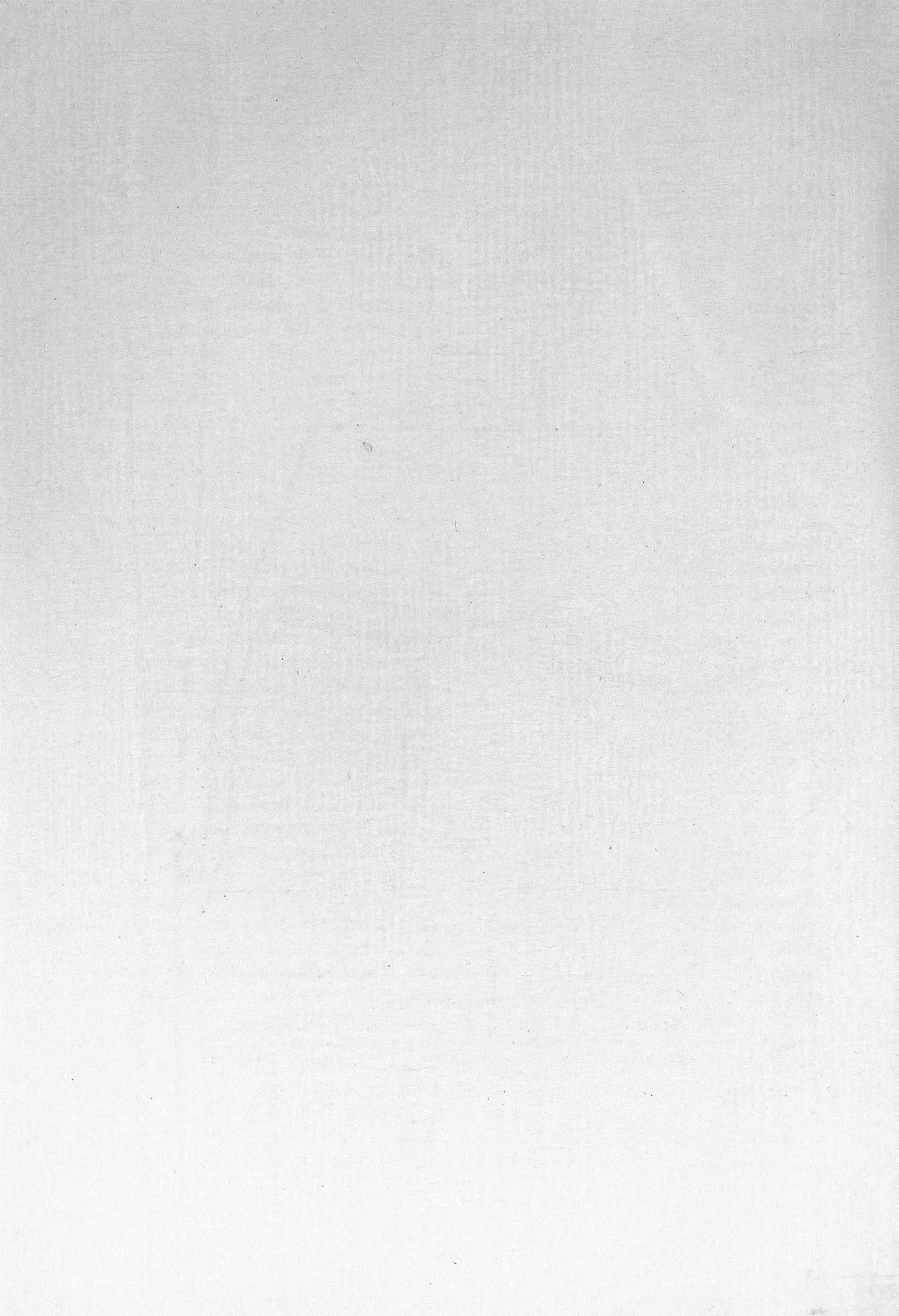
È qui che si dimostra l'utilità e la praticità del vaccinoscopio, che permette di vedere rapidamente se la densità del vaccino, diremo prodotto in giornata, corrisponde alla densità del vaccino campione, facendo rilevare l'errore dovuto ad una crescita minore o maggiore delle piastre (per minor durata del periodo d'incubazione, per diverso comportamento del materiale nutritizio, ecc.), errore che sarebbe altrimenti passato inosservato: esso permette nello stesso tempo di compensare questo errore, o coll'aggiunta di soluzione fisiologica se la densità è maggiore, o coll'aggiunta di emulsione batterica se la densità è minore. Gosio fa inoltre notare un'altra particolarità vantaggiosa del vaccinoscopio: da molteplici e minuziose indagini risulta cioè che vaccini di concentrazione doppia e tripla, misurati, esigono rispettivamente la metà, il terzo, ecc. di volume per produrre il voluto effetto ottico; si ha precisamente un rapporto inverso all'altezza del cilindro liquido, e quindi si può affermare che detto volume stia in ragione inversa col quantitativo batterico sospeso.

Prendendo dal Gosio un esempio pratico, se la cifra indice del volume di un vaccino testo è 15 cmc. mentre la cifra indice del volume di un vaccino identico, preparato oggi per esempio, è 12,8 cmc., vuol dire che questo vaccino è più denso, quindi molto più ricco in germi e per ridurlo alla densità tipo, cioè al numero di germi fissato, noi dovremo aggiungere una determinata quantità di soluzione fisiologica e questa quantità sarà di 15 meno 12,8 = 2,2, essendo infatti sospeso in centimetri 12,8 ciò che dovrebbe esserlo in 15. E se la massa intiera fosse di 3800 cmc. ne seguirebbe la equazione: 12.8 : 2,2 = 3800 : x

x = 653,1 che sarebbe quindi la quantità di soluzione fisiologica da aggiungere.

Schizzo prospettico dell'esterno

Sezione verticale

VACCINOSCOPIO GOSIO.

C cilindro di vetro cavo — *C'* cilindro che vi scorre dentro — *A* serbatoio ad imbuto
B coperchio dell'imbuto — *b* forellino — *S* sostegno metallico
D cannocchiale in cui s'infigge l'apparecchio di vetro — *d* disco smerigliato con croce nera
R rubinetto — *L* luce elettrica.

*
* *

Le esperienze di controllo di vaccino anticolerico e di vaccino antitifico misto (tifo e paratifico B.) col vaccinoscopio Gosio sono state condotte controllando prima il vaccino stesso col metodo del conteggio diretto, usando nel primo gruppo di esperienze il metodo Wright e nel secondo gruppo il metodo Thoma-Zeiss.

Nei laboratori dell'Istituto il Prof. Viganò ed il Dott. Negroni al principiare delle preparazioni vacciniche avevano stabilito soluzioni campione cui riferirsi nelle successive lavorazioni, conteggiando col metodo Wright i quantitativi di germi contenuti nell'ansa pesata di 2 mmgr., quantitativi che si aggirano incirca a oltre due miliardi e mezzo di germi.

In base a tale quantitativo ed alla superficie in cm^2 delle piatte in uso all'Istituto veniva facile il computo del numero d'anse contenute nelle singole piatte, calcolato ordinariamente a 200 per ciascuna. In base a questo ogni bottiglione di soluzione madre della capacità di un litro, veniva a contenere 4.000 anse, pari a 10.000 miliardi di germi per cmc. Da questo con altra semplice diluizione in soluzione fisiologica si veniva ad ottenere il vaccino col numero dei germi prestabilito.

Naturalmente io ho dovuto ricontrollare la cifra per vedere il rapporto tra conteggio ed opacità, sebbene, come già dissi, Rembold abbia affermato che tra i due sistemi la differenza è minima.

Non sono partito per il mio computo dall'ansa di 2 mmgr. che già universalmente è accettato da tutti contenere circa due miliardi e mezzo di germi; ho voluto invece controllare le soluzioni già pronte per l'uso onde riconoscere se il computo di anse rispetto alle superficie coltivate, come praticamente si adoperava, dava realmente quel quantitativo per cmc. che si era convenuto di fornire e cioè un miliardo e 300 milioni per cmc. di germi misti tifo e paratifo.

Il conteggio secondo il metodo Wright e Thoma-Zeiss di una serie di preparazioni vaccinali sarebbe stato il seguente:

Conteggio	I	prep.	Bott.		germi	per cmc.	1.958.515.000
»	II	»	4	» A	»	»	2.705.000.000
»	III	»	4	» B	»	»	2.430.000.000
»	IV	»	4	» B	»	»	2.630.000.000
»	V	»	4bis	» A	»	»	2.630.000.000
»	VI	»	4bis	» B	»	»	1.590.000.000

Tali conteggi furono in parte fatti da me stesso ed alcuni numerati dal Vicedirettore dell'Istituto, Prof. Ascoli, quale controllo; le cifre rappresentano le medie delle operazioni. (Primo conteggio col Wright, gli altri col Thoma-Zeiss).

Un'occhiata a tali cifre fa subito rilevare che il conteggio Wright dà cifre inferiori di quelle ottenute al Thoma-Zeiss. Questi errori sono con ogni probabilità dovuti ad un'imperfetta e punto uniforme distribuzione dei germi sui preparati da striscio, per quanto fatti con ogni cura, in confronto dei globuli rossi ed al difficile riconoscimento dei germi stessi causato dalla presenza di sostanze eterogenee nel preparato (depositi di sostanze coloranti, frammenti di fibrina, ecc.). Col metodo Thoma-Zeiss e colorando i germi, come io ho fatto, aspirando nella pipetta di diluizione una soluzione iodica, gli errori sono certamente minori essendo essi dovuti solo al fatto che taluni germi restano invisibili per insufficiente illuminazione, o perchè si trovano sulle righe dei quadratini; a meno che sianvi gruppi agglutinati, che io raramente ho riscontrato.

Un altro fatto importante che appare dall'osservazione della tabella si è il numero molto più alto di germi nel cmc. di quello che doveva esservi contenuto; indice sicuro che il computo in anse per superficie veniva alterato con ogni probabilità dalla mag-

gior crescita dei germi, per cui tale metodo di computo è, come era del resto facile a prevedersi, errato.

L'esame al vaccinoscopio Gosio è riportato nella tabella qui sopra (Tavola *A*).

Supposto per il momento di accettare la cifra al vaccinoscopio data dal Gosio di 3,4 (scala mill.) per un vaccino contenente un miliardo 150 milioni di germi, risulta evidente che l'istrumento segna immediatamente la maggior concentrazione del vaccino dell'Istituto, mettendosi d'accordo colla ci-

TAVOLA A

VALORI MEDI AL VACCINOSCOPIO GOSIO DI PARECCHIE PREPARAZIONI DI VACCINO ANTITIFICO.

Preparazione	Bott. A		Bott. B		Bott. C	
	Scala millimetrata	Scala volumetrica	Scala millimetrata	Scala volumetrica	Scala millimetrata	Scala volumetrica
I	2.5	10.1	2.4	10	2.5	10.1
II	2.5	10.1	2.6	10.2	2.6	10.2
III	2.4	10	2.2	9	2.3	9.1
IV	2.3	9.1	2.2	9	2.5	10.1
IV bis	2.5	10.1	3	13	3.3	14
V	2.6	10.2	2.2	9	2.5	10.1
VI	2.3	9.1	2.4	10	2.6	10.2

TAVOLA B

TENORE IN GERMI E VALORE AL VACCINOSCOPIO DI ALCUNI VACCINI ANTITIFICI.

Preparazione	Germi per cmc. di soluzione diluita	Valori al vaccinoscopio	
		Scala millimetrata	Scala volumetrica
83	* 1.958.000.000	(17 nov.) 3.6	15
		(28 dic.) 4.2	17.2
4a	2.705.000.000	2.3	9.1
	2.330.000.000	2.2	9
4 bis	1.590.000.000	3.	13.

NB. — Il valore segnato coll'asterisco è stato ottenuto col conteggio secondo il metodo di Wright ed è perciò più suscettibile d'errore.

fra trovata al conteggio, che è quasi doppia dello stabilito.

Data però la tecnica sempre uguale, dalla tabella appare una concordanza molto notevole tra le varie preparazioni.

Se poi confrontiamo i dati ottenuti col conteggio con quelli del vaccinoscopio troviamo i valori nella tavola *B*.

Dai risultati qui sopra esposti (tavole *A* e *B*) appare che sia i conteggi come i va lori del vaccinoscopio si corrispondono ab bastanza bene, avendosi per un vaccino più ricco in germi un valore più basso al vac cinoscopio; ma questo, come vedremo, viene ottenuto soltanto se si adoperano certe pre cauzioni.

Il vaccino da esaminare al vaccinoscopio *deve essere fresco, perchè col tempo suc cedono fenomeni di autolisi che ne diminuiscono l'opacità ed alterano quindi il valore della lettura* (vedi ad es. la differenza fra le due letture della preparazione 83 del tifo, fatte a distanza di un mese una dall'altra e quelle più evidenti per il colera, tavola *D*).

Accettando ora come dobbiamo i valori che risultano dalle osservazioni precedenti, sia forniteci dal conteggio che dal vaccinoscopio, vediamo praticamente come si possono ridurre le proporzioni alla voluta diluizione.

Prendiamo ad es. in esame la preparazione IV, bott. *B* (tav. *B*), la quale dalla media di due conteggi (quindi presumibilmente esatti) risultava contenere 2.530.000.000 di germi per cmc. invece del miliardo e 300 milioni. Basandosi su questo, con una progressione sarebbe facile ridurre al titolo esatto tale emulsione; infatti: 1.300.000.000 risulta essere il 51,42 % di 2.530.000.000; prendendo quindi 514,2 cmc. della soluzione troppo ricca ed aggiungendovi 485,8 cmc. di soluzione fisiologica si ottiene un litro di nuova soluzione che ha la concentrazione desiderata di 1.300.000.000 di germi per cmc.

Come ognuno vede non è possibile in pratica ogni volta fare un conteggio per ridurre alle proporzioni volute l'emulsione madre. Il vaccinoscopio secondo Gosio ci dice che essa con un'emulsione di bacilli tifici e paratifici contenenti complessivamente un miliardo e 150 milioni di germi dà una cifra indice sulla scala millimetrata di 3,4, pari a 14 della scala volumetrica.

La nostra preparazione IV, bott. B, dà al vaccinoscopio una cifra media di 2,2 alla scala millimetrata, corrispondente a 9 della scala volumetrica.

Riducendo questa emulsione a contenere 1.300.000.000 di germi per cmc. ed esaminandola al vaccinoscopio ottengo una cifra indice per la scala millimetrata di 3,8 corrispondente a 15,2 della scala volumetrica. Questa resta quindi per me *la cifra testo* a cui devo ridurre ogni mio bottiglione per ottenere nel cmc. circa 1.300.000.000 di germi.

Infatti se la cifra indice volumetrica di un vaccino testo è 15,2 mentre la cifra in dice di un vaccino identico freschissimo per esempio è 12, vuol dire che questo vaccino è più denso, cioè più ricco in germi; per ridurlo alla densità tipo noi dovremo aggiungere una determinata quantità di soluzione fisiologica, la quale sarà proporzionale all'eccesso di densità denunziatoci dall'indice volumetrico, ossia $15,2 - 12 = 3,2$, essendo sospeso in cmc. 12 ciò che dovrebbe esserlo in 15,2. Se la massa che abbiamo fosse di cmc. 3000 ne seguirebbe la proporzione di $12 : 3,2 = 3000 : x$, ossia l'indice volumetrico sta all'eccesso denunziatoci come il volume che abbiamo sta al volume che dobbiamo aggiungere per avere la soluzione voluta. Risolvendo avremo

$$x = \frac{3,2 \times 3000}{12} = 800$$

che sarebbero i centimetricubici da aggiungere all'emulsione per renderla del tipo fis-

sato: quindi nel mio caso invece di diluire 375 cmc. in 2625 cmc. dovrò diluire in 2625 più 800, cioè in 3425 centimetricubici.

Se noi volessimo confrontare i due reperti ottenuti col conteggio e col vaccinoscopio tra di loro, troveremmo che le cifre di diluizione non decorrono parallele tra loro come vuole il Rembold, ma che invece starebbero l'una verso l'altra poco meno di 2 : 1 e cioè il conteggio imporrebbe una maggiore diluizione di quella voluta dal vaccinoscopio.

Con ogni probabilità la mancanza di parallelismo è dovuta in questo caso a difetto d'osservazione, nel senso cioè che le due ricerche non sono state fatte in modo contemporaneo come era necessario per una corrispondenza perfetta, eliminando ogni fenomeno d'autolisi nelle soluzioni.

Se si osserva infatti la tabella qui sopra essa ci dà la chiave del fenomeno (tavola *C*).

Qui le osservazioni vaccinoscopiche vennero fatte quasi contemporaneamente con bacilli vivi appena appena tolti dal termostato, dove non vi è stata autolisi. La cifra indice del vaccinoscopio è di 1.9 per il b. del tifo, 1.8 per il b. del paratifo per 2.500.000.000 di germi, che rappresenta incirca la concentrazione doppia di 3.8, cifra che deve essere molto vicina al vero.

Il vaccinoscopio quindi risponde adeguatamente allo scopo prefisso di avere uno strumento che rapidamente e praticamente ci dica il valore di una preparazione di vaccino.

È naturale che questo genere di apparecchi non possa dare cifre assolutamente esatte; esse hanno tuttavia abbastanza sensibilità da togliere errori anche non grossolani e dare proporzioni sempre confrontabili tra loro.

A questo proposito mi piace far risaltare un'osservazione fatta durante queste esperienze: esaminando i risultati ottenuti io mi stupivo d'una risultanza che il vaccino, pur preparato con la tecnica esatta ed usuale, mi dava secondo i conteggi una percentuale maggiore in germi per cmc.; prendendo infatti la cifra media delle mie numerazioni coi sistemi Thoma-Zeiss e Wright (media di 4 conteggi della tab. $B = 2.339.000.000$), io avrei circa un miliardo di germi in più del previsto (1.300.000.000, Tav. *B*).

Il vaccinoscopio pure dava una cifra media di 2.8 che mi indicava una maggiore densità del vaccino e quindi una maggiore ricchezza in germi. Studiandone le cause mi colpì il fatto che le piatte di paratifo B crescevano molto più rigogliose che non

TAVOLA C

Preparazione	Tenore in germi	Scala millimetrata	Scala volumetrica
Soluzione contenente germi tifo	2.500.000.000	1.9	7.2
» » » paratifo B	idem	1.8	7.1
Soluzione precedente ridotta tifo	1.300.000.000	3.6	15
» » » paratifo B	idem	3.5	14.2
Soluzione contenente secondo Gosio _ _ _ _ _	1.150.000.000	3.4	14
Soluzione contenente secondo miei conteggi (Prep. 4ª)	2.530.000.000	2.2	9

quelle del tifo, pur mantenendole nelle medesime condizioni. L'esame al vaccinoscopio di varie piatte, sia di tifo come di paratifo B, diede un risultato per il primo di una media di 4.5 (una piatta in 400 cmc.) e per il secondo una media di 3.2 (una piatta per 400 cmc.): ciò mi indicava dunque che la piatta di paratifo era molto più ricca in germi di quella del tifo e logicamente la maggiore ricchezza in germi del vaccino misto era dovuta al maggiore accrescimento del paratifo. Questo venne poi confermato dal fatto che nelle prove di agglutinazione del siero di persone vaccinate col nostro vaccino antitifico, in seguito ad un'epidemia di tifo, il tasso di agglutinazione del paratifo B era salito molto più alto di quello del tifo, ciò che per un momento fu per noi inspiegabile.

Così ci accadde in qualche preparazione di vaccino misto, con ceppi di paratifo molto virulenti, forniti dalla Direzione di Sanità, che mentre la prova di sterilità del vaccino era perfetta, la prova biologica dava la morte a molte cavie coi quantitativi di vaccino che un tempo erano perfettamente sopportati da esse. Il fatto ci venne subito spiegato dal vaccinoscopio che ci svelò come le piatte di questo paratifo apparentemente uguali a quelle del tifo erano invece assai più ricche in germi e le proporzionali tra questo e quello erano a scapito di questo, per cui il vaccino trovandosi più ricco in paratifo era causa di morte alle cavie per il maggiore potere tossico di questo.

TAVOLA D.

Preparazione	Valore al vaccinoscopio Scala millimetrata	Tenore in germi per cmc. Soluz. dil. 500 più 2500	Metodo di conteggio
78	1.5 recentissimo 2.6 dopo un mese	13.379.000.000	Wright (autore)
78	1.5 recentissimo 2.6 dopo un mese	10.195.000.000	» »
78	1.5 recentissimo 2.6 dopo un mese	9.840.000.000	» »
80	1.7 recentissimo 3 dopo un mese	5.780.000.000	Thoma-Zeiss (autore)
80	1.7 recentissimo 3 dopo un mese	6.140.000.000	» » »
80	1.7 recentissimo 3 dopo un mese	4.000.000.000	» » (Ascoli)

NB. — Questa forte diversità è dovuta con ogni probabilità a difetto nella preparazione dello striscio, dove non è facile distribuire uniformemente i microorganismi. Il fatto si verifica, poichè tra un campo e l'altro la differenza può essere grandissima.

***

Per le esperienze col vaccino anticolerico ho provveduto nello stesso modo, facendo anche qui due gruppi di conteggi, uno col

metodo Wright ed uno col metodo Thoma-Zeiss; l'ultimo conteggio di questo secondo gruppo venne fatto come controllo dal Professor Ascoli. Nella tavola *D* trovansi i risultati di questi conteggi.

Tutto ciò mi porta a ritenere che il basarci, per calcolare la ricchezza in germi di un vaccino, sul numero delle anse che possono crescere in una piastra, sia un errore, potendosi avere infatti le variazioni sopracitate e perciò mi sembra più logico ricorrere al vaccinoscopio che, dandomi le differenti densità, mi permette di ridurre il vaccino all'opacità giusta e quindi al numero di germi fissato.

Dal complesso di tutte queste ricerche, di cui io mi limito a dare soltanto i risultati più salienti, appare in modo evidente l'utilità dell'uso di un vaccinoscopio quale è quello del Gosio di fronte alla semplice emulsione dosata in base al calcolo di superficie che può dare perfino concentrazioni doppie del supposto.

Il vaccinoscopio, indicando le differenti densità, permette di ridurre il vaccino all'opacità giusta e quindi al numero di germi prestabilito. Il vaccinoscopio è necessario nella preparazione dei vaccini misti perchè i varii tipi siano aggiunti nelle giuste proporzioni. Il vaccinoscopio può indicare anche il grado di autolisi cui il vaccino va assoggettandosi col tempo, stabilendo quindi il grado di valore, dato che l'autolisi lo sciupi come è presumibile. Dopo tutto quanto si è detto parmi che volendo uniformare ad uno stesso tipo il vaccino da adoperare per l'esercito la cosa riesca facile quando si voglia partire, come si è fatto da noi, da una soluzione campione titolata al vaccinoscopio, stabilita in base al peso di una patina batterica e contenente 2 milligr. di essa per cmc.; così facendo gli errori si riducono al minimo.

Naturalmente per ottenere risultati costanti, e non in disarmonia tra loro, è necessario che le operazioni da farsi per stabilire gli indici campioni siano compiute su emulsioni di recentissima preparazione contemporanee ed inoltre fatte costantemente colla stessa tecnica. Tenendo presente tutte queste difficoltà nella titolazione del vaccinoscopio, che con un po' di pazienza sono facilmente sormontabili, si riesce ad avere in esso un istrumento rapido e di pratica applicazione nel diluire o concentrare le emulsioni batteriche al titolo voluto.

Ringrazio il Prof. Belfanti ed il Professor Ascoli, nonchè il collega Dott. Negroni, che mi vollero aiutare in queste ricerche.

BIBLIOGRAFIA.

BUJWID ODO, *Eine neue Methode der Bestimmung von Bakterienmengen.* Centralbl. f. Bakt., 1e Abt., Orig., Bd. 77, N. 3.

GOSIO B., *Nuovo apparecchio per rapide titolazioni dei vaccini batterici.* Boll. R. Accad. Med. di Roma, Anno XLII, fasc. 3-4.

— — *Vaccini anticolerico ed antitifico, con particolare riguardo alla preparazione in grande.* Boll. R. Acc. Med. di Roma, anno XLII, N. III-IV.

PORCELLI TITONE, *Alcune norme di tecnica per la preparazione dei vaccini, ecc.* Riforma Med., Anno XXXI, N. 42.

VON REMBOLD, *Ueber den Keimgehalt von Cholera- und Typhusimpfstoffen.* Münchner Med. Wochenschrift, N. 30, 1915.

SOLTMANN H., *Die Prüfung der zur Schutzimpfung gegen Cholera hergestellten Impfstoffe.* Zeitschrift f. Hyg., LXXX, pag. 323.

VALAGUSSA F., *Un metodo di rapida valutazione del contenuto in germi dei vaccini bacterici. Considerazioni pratiche sulla vaccinazione alla Wright.* Il Policlinico, Sez. Prat., 1914, fasc. 43.

WINTERBERG H., *Zur Methodik der Bakterienzählung.* Zeitschrift für Hygiene, vol. 29, pag. 75.